

На правах рукописи

Хаертдинов Наиль Назимович

**ЭФФЕКТЫ И МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ СЕРОВОДОРОДА НА
СОКРАТИТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ МИОКАРДА ЛЯГУШКИ**

03.03.01 – физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2011

Работа выполнена на кафедре физиологии человека и животных федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»
Федерального агентства по образованию и науке РФ

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Ситдикова Гузель Фаритовна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Аникина Татьяна Андреевна

доктор биологических наук, профессор
Тарасова Ольга Сергеевна

Ведущая организация: Учреждение Российской академии медицинских наук НИИ нормальной физиологии им. П. К. Анохина РАМН (г. Москва).

Защита состоится «27» марта 2012 г. в « ____ » часов на заседании Диссертационного совета Д 212.078.02 при ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Федерального агентства по образованию и науке РФ по адресу: 420008, г. Казань, ул. Левобулачная, д. 44

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Федерального агентства по образованию и науке РФ www.ksu.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.м.н. профессор



Зефилов Т.Л.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Исследование механизмов внутрисердечной регуляции сократимости миокарда является одним из актуальных направлений в физиологии сердца. Достаточно подробно изучена роль холин- и адренергических факторов в регуляции деятельности сердца (О.С. Тарасова, 2005). Ведутся исследования об участии пуринорецепторов в регуляции работы сердца и сосудов в онтогенезе (Т.А. Аникина, Ф.Г. Ситдилов, 2011). Сероводород (H_2S) – газ, обладающий хорошо известными токсическими эффектами, связанными с нарушением окислительного фосфорилирования в клетке (R.J. Reiffenstein et al., 1992). Однако, все больше данных свидетельствует о том, что H_2S эндогенно синтезируется и оказывает физиологические эффекты в сердечно-сосудистой, нервной и эндокринной системах, а также в желудочно-кишечном тракте (Г.Ф. Ситдикова, А.Л. Зефилов, 2006, 2010, Е.В. Герасимова, Г.Ф. Ситдикова, 2008, G.F. Sitdikova, 2010, D.J. Elsey et al., 2010, Н. Kimura et al., 2010). H_2S был предположен в качестве эндогенного «газомедиатора» наряду с двумя другими физиологически активными газами - оксидом азота (NO) и монооксидом углерода (Г.Ф. Ситдикова, А.Л. Зефилов, 2006, 2010, M.M. Gadalla, S.H. Snyder, 2010). В сердечно-сосудистой системе H_2S синтезируется из L-цистеина цистатионин γ -лиазой и 3-меркаптосульфотрансферазой (B. Geng et al., 2004, G. Yong et al., 2008, D.J. Elsey et al., 2010) и оказывает целый ряд эффектов, включая вазодилатацию, регуляцию пролиферации и апоптоза, ангиогенез (M.M. Gadalla, S.H. Snyder, 2010, Г.Ф. Ситдикова, А.Л. Зефилов, 2010). Имеются данные о кардиопротекторной роли H_2S , выражающейся в уменьшении повреждений миокарда в условиях ишемии/реперфузии в экспериментах *in vitro* и *in vivo* (B. Geng et al., 2004, J.S. Bian, et al., 2006, D.J. Elsey et al., 2010). В единичных исследованиях показано, что H_2S оказывает отрицательный инотропный эффект в сердце различных видов теплокровных животных и уменьшает длительность потенциала действия рабочих кардиомиоцитов (Д.В. Абрамочкин, 2009, B. Geng et al. 2004, Y.G. Sun, Y.X. Cao, W.W. Wang et al., 2008). Механизмы действия H_2S малоизученны и включают, по разным данным, систему аденилатциклазы, АТФ-зависимые К-каналы и потенциал-зависимые Са-каналы L-типа в зависимости от вида животного (M. Xu et al., 2007, Y.G. Sun, Y.X. Cao, W.W. Wang et al., 2008, G. Yong, et al., 2008, Д.В. Абрамочкин, 2009). Показано влияние H_2S на сосудистый тонус у всех классов позвоночных животных (рыб, амфибий, рептилий) и включает как вазоконстрикцию, так и вазодилатацию, что указывает на филогенетическую древность H_2S как газомедиатора и универсальность его действия (R.A. Dombkowski et al. 2004, K.R. Olson, et al. 2005). Данные о действии H_2S на сократимость миокарда холоднокровных животных отсутствуют. Таким образом, сведения о регуляции функций сердца с помощью нового газообразного посредника - H_2S во многом фрагментарны, а молекулярные

мишени его влияния не определены. Поэтому исследование эффектов и мишеней действия экзогенного и эндогенного сероводорода на сократимость миокарда лягушки является актуальным.

Цель и задачи исследования

Целью исследования являлось выявление эффектов и механизмов действия сероводорода на сократимость миокарда лягушки

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Изучить действие донора сероводорода - гидросульфида натрия на сократимость миокарда лягушки.
2. Выявить эффекты субстрата синтеза сероводорода L-цистеина и блокаторов фермента синтеза газа цистатионин γ -лиазы на сократимость миокарда лягушки.
3. Проанализировать роль потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа и внутриклеточных кальциевых депо в эффектах гидросульфида натрия на сократимость миокарда.
4. Выявить влияние гидросульфида натрия на сократимость миокарда на фоне активации и ингибирования различных типов калиевых каналов.
5. Проанализировать роль закисления внутриклеточной среды в отрицательном инотропном эффекте гидросульфида натрия.
6. Выявить роль системы аденилатциклазы в эффектах сероводорода.
7. Исследовать взаимодействие системы оксида азота и сероводорода в регуляции сократимости миокарда
8. Проанализировать влияние сероводорода в условиях активации β -адренорецепторов и блокирования фосфодиэстераз.

Положения, выносимые на защиту:

1. Экзогенный и эндогенный сероводород оказывает обратимый и дозозависимый отрицательный инотропный эффект и уменьшает максимальные скорости укорочения и расслабления в желудочковом миокарде лягушки.
2. Отрицательный инотропный эффект сероводорода в миокарде лягушки опосредуется снижением входящего кальциевого тока в результате активации АТФ-чувствительных K-каналов и цГМФ-стимулируемой фосфодиэстеразы II типа.

Научная новизна

В работе впервые показано, что гидросульфид натрия – донор H_2S обратимо и дозозависимо снижал силу сократимости и уменьшал максимальные скорости укорочения и расслабления полоски миокарда лягушки. При этом субстрат синтеза сероводорода L-цистеин также оказывал отрицательный инотропный эффект, а блокатор цистатионин γ -лиазы увеличивал амплитуду сокращения, что указывает на возможность

эндогенного синтеза H_2S в сердце холоднокровных животных. Впервые исследованы внутриклеточные механизмы действия сероводорода в миокарде лягушки. Показано, что одной из мишеней действия H_2S являются АТФ-чувствительные калиевые каналы, активация которых вызывает гиперполяризацию мембраны, снижение входящего Са-тока и уменьшение силы сокращения. Впервые показано взаимодействие системы NO и H_2S в регуляции сократимости миокарда. Кроме того, впервые выявлена роль аденилатциклазной системы в эффектах H_2S . Предположено, что активация фосфодиэстераз, гидролизующих цАМФ, в частности фосфодиэстеразы II, при действии H_2S , особенно в условиях активации β -адренорецепторов, приводит к уменьшению уровня цАМФ в клетке и снижению входящего Са-тока, что сопровождается понижением силы сокращения.

Научно-практическая ценность

Полученные в работе данные расширяют представления о возможности регуляции сократительной функции миокарда эндогенными физиологически активными соединениями. Это, в частности, касается вопросов влияния газообразных посредников, имеющих уникальные свойства, отличающие их от классических медиаторов, на сократимость миокарда холоднокровных животных. Научную ценность представляют данные об участии АТФ-зависимых калиевых каналов и фосфодиэстераз в эффектах H_2S , что в дальнейшем позволит провести эволюционный анализ механизмов регуляции инотропной функции сердца эндогенными газообразными посредниками как у холоднокровных, так и у теплокровных животных. Полученные данные имеют не только теоретическое, но и практическое значение при разработке средств фармакологической коррекции сердечной деятельности. Результаты исследования представляют практическую ценность для физиологов, биофизиков, биохимиков, фармакологов и нейрохимиков. Полученные данные используются при чтении лекций на кафедре физиологии человека и животных Казанского (Приволжского) федерального университета. Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (09-04-00748); «Ведущая научная школа» (НШ-5250.2010.4), гранта К. Цейс.

Личный вклад диссертанта

Приведенные в работе данные получены при личном участии соискателя на всех этапах работы, включая составление плана исследования, проведение экспериментов, обработку полученных данных и оформление публикаций.

Достоверность полученных данных

Достоверность полученных данных подтверждалась использованием достаточного объема экспериментальных исследований, постановкой и решением поставленных задач, статистической обработкой полученных результатов.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы доложены на следующих конференциях и съездах: международном XIII Биологическом симпозиуме студентов и аспирантов «SymBioSE 2009», Международной конференции

«Рецепция и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2009, 2011), Всероссийском с международным участием, научном симпозиуме «Растущий организм: адаптация к физической и умственной нагрузке» (Казань, 2009, 2010), международной конференции молодых ученых "Биология - наука 21-го века" (Пушино, 2009, 2010), XX Съезде физиологического общества имени И.П. Павлова (Калуга 2010), Международном симпозиуме «Biological motility» (Пушино, 2009), XVII и XVIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (МГУ, 2010, 2011), XV и XVI Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине» (Казань, КГМУ, 2010, 2011), ежегодных научных конференциях в Казанском федеральном университете.

Реализация результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 20 печатных работ, в том числе 4 публикации в рецензируемых журналах (из списка ВАК).

Структура и объем диссертации

Диссертация объемом 120 страниц состоит из введения, обзора литературы, описания методики исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов и списка литературы. Список цитируемой литературы включает 310 источников, из них 34 - отечественных и 276 - иностранных авторов. Диссертация содержит 30 рисунков и 2 таблицы.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на 320 разнополых лягушках *Rana ridibunda* в осенне-зимний период. Эксперименты проводились с использованием миокарда лягушки. Сократительную активность миокарда в эксперименте *in vitro* изучали на изолированных полосках желудочков сердца с использованием метода тензометрии на установках Power Lab (AD Instruments, Австралия) или Biopac Systems, Inc. (США), оснащенных изометрическими датчиками силы MLT 050/D или TSD 125C с диапазоном измерений 0-50 грамм. Препарат стимулировали электрическими импульсами с частотой 0.1 Гц через два серебряных электрода. Запись кривой сокращения регистрировали на персональном компьютере при помощи программного обеспечения "Chart 5.3". Сигналы обрабатывали с помощью программы Chart или Elf (автор А.В.Захаров), силу сокращения определяли в граммах. Оценивали амплитуду сокращения, а также максимальные скорости укорочения и расслабления. Статистический анализ проводили с помощью стандартных методов, достоверность различий определяли с помощью параметрического t-критерия Стьюдента (Г.Ф. Лакин, 1973).

Наркотизированное животное фиксировали, вскрывали грудную клетку и быстро извлекали сердце, которое помещали в специальную ванночку со стимуляцией. Из ткани миокарда желудочков вырезались полоски длиной 4-6

мм и шириной 0.8-1.0 мм. Препарат фиксировали вертикально одним концом к датчику, другим - к фиксирующему блоку и помещали в резервуар объемом 20 мл, в который подавался раствор Рингера для холоднокровных животных, содержащим в мМ: 118.0 NaCl, 2.5 KCl, 1.8 CaCl, 10 Trizma (pH – 7.3-7.4 T=20°C). После погружения препарата в резервуар следовал «период приработки» в течение 40-60 мин, в ходе которого мышечным волокнам постепенно придавалось оптимальное натяжение. По окончании приработки регистрировались исходные параметры сокращения в течение 5 мин, после чего в резервуар добавлялись фармакологические агенты. По окончании регистрации фармакологических веществ, препарат изолированной полоски миокарда отмывали рабочим раствором в течение 10 минут.

В качестве донора H₂S использовали гидросульфид натрия (NaHS), так как в водном растворе он диссоциирует до Na²⁺ и HS⁻, затем HS⁻ связывается с H⁺ с образованием H₂S. В нейтральном растворе одна треть NaHS находится в виде газа – H₂S и оставшиеся две трети – в виде HS⁻ (R.O. Beauchamp et. al., 1984). В экспериментах использовали: блокаторы и активаторы ионных каналов - нифедипин, глибенкламид, миноксидил, тетраэтиламмоний (ТЕА), NS 8593, 4-аминопиридин (4-АП), кофеин, субстрат синтеза H₂S – L-цистеин, блокаторы цистатионин γ-лиазы – β-цианоаланин и пропаргилглицин, неспецифичный блокатор фосфодиэстераз – 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), аналоги циклических нуклеотидов – 8BrcAMP, 8-(4-Chlorophenylthio)adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (pCPT-cAMP), ингибитор аденилатциклазы – cisN-(2-phenylcyclopentyl) azacyclotridecl-en-amine hydrochloride (MDL-12,330A), блокатор NO-синтазы - N^G-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME), донор NO - S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP), блокатор фосфодиэстеразы II - erythro-9-(2-hydroxy-3nonyl)-adenine) hydrochloride (EHNA), агонист β-адренорецепторов - изопротеренол. Вещества, нерастворимые в воде, растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Концентрация ДМСО в подаваемых растворах не превышала 0.1%, в данной концентрации ДМСО в контрольных экспериментах не оказывал влияния на силу сокращения миокарда. Все использованные вещества фирмы Sigma (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эффекты донора H₂S – NaHS на сократимость изолированной полоски миокарда желудочка. Аппликация NaHS, донора H₂S, в концентрациях 10–500 мкМ приводила к дозозависимому снижению силы сокращения изолированной полоски миокарда желудочка. Была выявлена эффективная концентрация (EC₅₀) NaHS, которая составила 38±14 мкМ (Рис. 1 А, Б). Отрицательный инотропный эффект NaHS наблюдался с первых минут аппликации и выходил на плато к 20 мин эксперимента (Рис.1 А). Таким образом, NaHS оказывает отрицательный инотропный эффект в миокарде лягушки. Подобное действие NaHS также наблюдалось и у теплокровных животных (G. Yong, 2008; K.R. Olson, 2008). В дальнейших

экспериментах использовали NaHS в концентрации 100 мкМ, который к 20 мин эксперимента снижал силу сокращения полоски миокарда до $66 \pm 6\%$ ($n=14$, $p<0.05$).

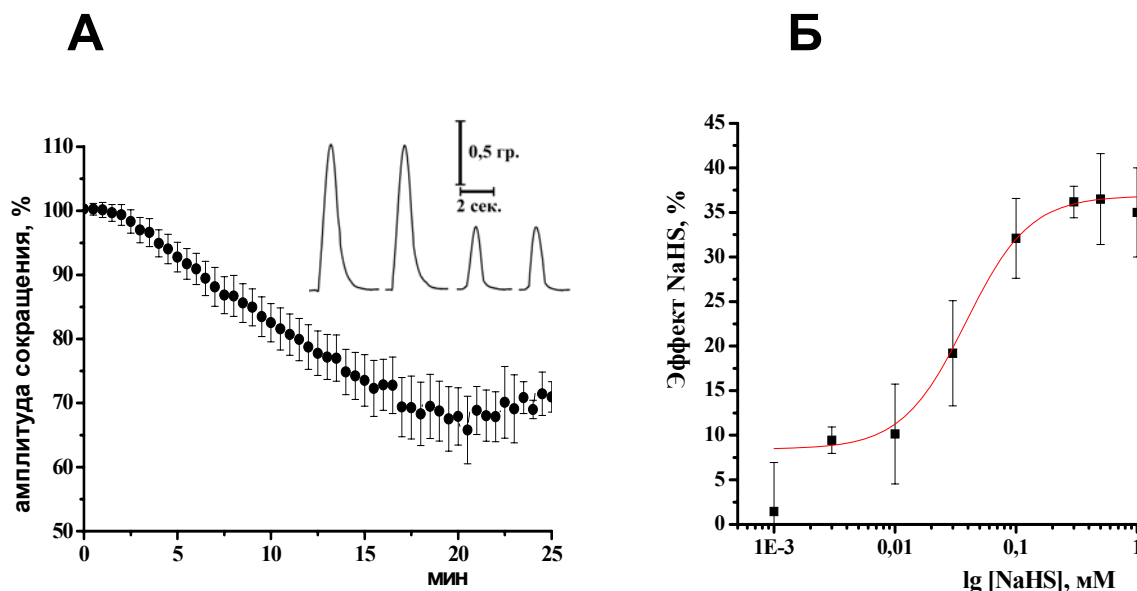


Рис. 1. Отрицательный инотропный эффект NaHS в миокарде желудочка лягушки.

А – Изменение амплитуды сокращений полоски миокарда при действии NaHS (100 мкМ) во времени. На вкладке показаны механограммы сокращения полоски миокарда в контроле и к 20 минуте аппликации NaHS,

Б – дозозависимость эффекта NaHS на амплитуду сокращения миокарда лягушки.

Влияние субстрата синтеза H_2S - L-цистеина и блокаторов фермента синтеза H_2S на амплитуду сокращения изолированной полоски миокарда. Для выявления возможности эндогенного синтеза H_2S использовали L-цистеин и блокаторы цистатионин γ -лиазы – одного из известных ферментов синтеза H_2S в миокарде. При добавлении L-цистеина в концентрации 200 мкМ наблюдалось снижение амплитуды сокращения полоски миокарда до $83 \pm 6\%$ ($n=6$, $p<0.05$), а в концентрации 1 mM L-цистеин угнетал силу сократимости до $58 \pm 4\%$ ($n=7$, $p<0.05$) относительно контрольных значений к 20 мин аппликации (Рис. 2 А, Б). Для блокирования цистатионин γ -лиазы использовали β -цианоаланин и пропаргилглицин в концентрациях 500 мкМ. Аппликация β -цианоаланина приводила к повышению силы сократимости миокарда до $117 \pm 6\%$ ($n=8$, $p<0.05$) относительно контрольного уровня, а пропаргилглицина – до $112 \pm 3\%$ ($n=8$, $p<0.05$) к 15 мин аппликации (рис. 2 Б). Таким образом, эндогенно синтезируемый H_2S вызывал такие же эффекты, что и экзогенно апплицируемый, а блокаторы цистатионин γ -лиазы приводили к противоположному эффекту. В условиях блокирования цистатионин γ -лиазы

β -цианоаланином аппликация L-цистеина в концентрациях как 200 мкМ, так и 1 мМ не вызывала отрицательного инотропного эффекта.

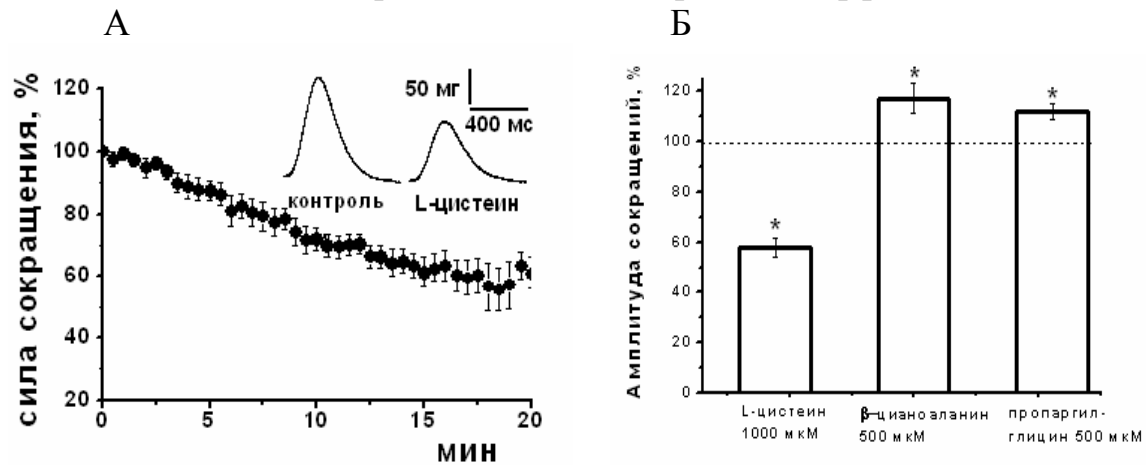


Рис. 2. Влияние субстрата и блокаторов синтеза сероводорода на сократимость миокарда

А – Динамика изменения силы сокращения при действии субстрата синтеза H_2S L-цистеина в концентрации 1 мМ. На вкладке показаны оригинальные записи сокращений в контроле и при действии L-цистеина к 20 мин аппликации.

Б – Изменение силы сокращения миокарда при действии L-цистеина (1 мМ) и блокаторов цистатионин γ -лиазы – β -цианоаланина (500 мкМ) и пропаргилглицина (500 мкМ). * $p < 0.05$

Роль Са-каналов в эффектах NaHS на сократимость изолированной полоски миокарда желудочка. Известно, что ионы Са играют ключевую роль в регуляции сократимости миокарда. В ответ на деполяризацию мембраны кардиомиоцитов происходит открытие потенциал-зависимых Са-каналов L-типа, вход Ca^{2+} , который вызывает высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных Са-депо через рианодиновые рецепторы и запускает процесс мышечного сокращения (M. D. Bers, 2002). Отрицательный инотропный эффект NaHS может быть связан с угнетением потенциал-зависимых Са-каналов L-типа, тем более, подобное влияние NaHS наблюдалось в кардиомиоцитах крысы (Y.G. Sun et al., 2008). Для блокирования потенциал-зависимых Са-каналов L-типа использовали нифедипин в концентрации 10 мкМ. Нифедипин приводил к снижению силы сокращения до $75 \pm 5\%$ ($n=5$, $p < 0.05$) (Рис. 3 А,Б). На фоне действия нифедипина NaHS уменьшал амплитуду сокращения до $72 \pm 2\%$ ($n=5$, $p < 0.05$) (Рис 3Б), что не отличалось от значений, полученных в контроле при аппликации NaHS. Следовательно, в сердце лягушки отрицательный инотропный эффект NaHS не связан с угнетением входящего Са-тока.

Для исследования роли внутриклеточных Са-депо в эффектах NaHS использовали кофеин, активирующий рианодиновые рецепторы саркоплазматического ретикулума. Аппликация кофеина в концентрации 3 мМ приводила к увеличению амплитуды сокращения миокарда до $127 \pm 11\%$ ($n=6$, $p < 0.05$). Эффект NaHS на фоне действия кофеина полностью

сохранялся и к 20 мин аппликации составил $48 \pm 5\%$ ($n=6$, $p<0.05$) (Рис. 3Б). Таким образом, отрицательный инотропный эффект H_2S в миокарде лягушки не связан с его влиянием на выброс ионов Са из внутриклеточных Са-депо.

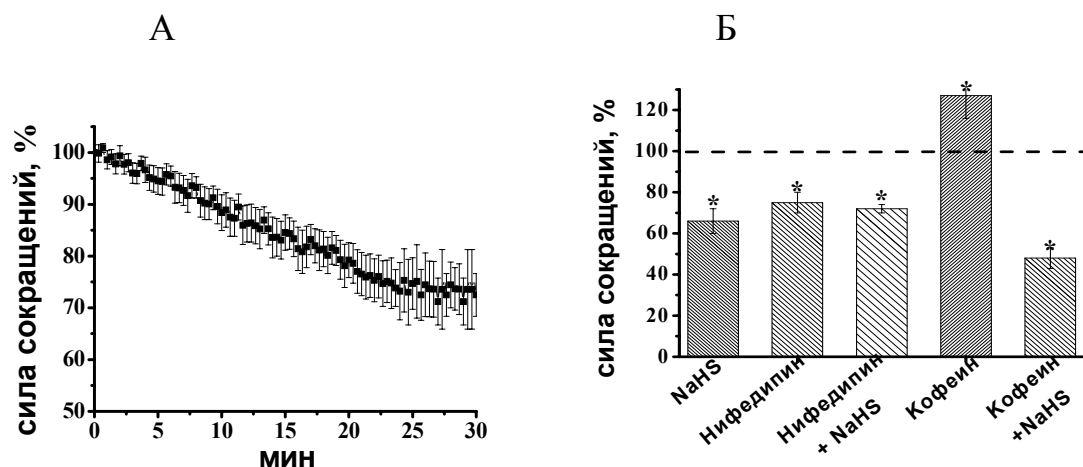


Рис.3. Роль потенциал-зависимых Са-каналов и внутриклеточных Са депо в отрицательном инотропном эффекте NaHS

А- Динамика изменения силы сокращения при ингибировании Са-каналов L-типа нифедипином (10 мкМ).

Б - Изменение силы сокращения при аппликации NaHS, нифедипина, кофеина и NaHS на фоне действия нифедипина и кофеина. При анализе эффектов NaHS за 100% принимались значения, полученные в контроле и на фоне действия нифедипина и кофеина. * $p<0.05$

Роль К-каналов в отрицательном инотропном эффекте NaHS в изолированной полоске миокарда лягушки. Известно, что целый ряд К-токов участвует в реполяризации мембраны кардиомиоцитов в различные фазы потенциала действия. К ним можно отнести два типа быстро активирующихся и инактивирующихся К-токов ($I_{to,f}$ и $I_{to,s}$) и несколько компонентов К-токов задержанного выпрямления, включающих I_{Kr} (rapid), I_{Ks} (slow), I_{Kur} (ultrarapid) и др. (J.M. Nerbonne, 2005, J. Tamargo et al., 2004). Кроме того, в регуляции длительности потенциала действия и сократимости миокарда могут принимать участие и недавно выявленные в сердце теплокровных животных Са-активируемые К-каналы малой проводимости (Y. Xu et al., 2003).

Для ингибирования К-каналов использовали неселективный блокатор К-каналов ТЕА. Аппликация ТЕА в концентрациях от 3 до 10 мМ. увеличивала силу сократимости полоски миокарда до $159 \pm 24\%$ ($n=5$, $p<0.05$), $202 \pm 23\%$ ($n=7$, $p<0.05$) и $194 \pm 12\%$ ($n=4$, $p<0.05$) (Рис. 4) относительно контрольных значений, соответственно. На фоне действия ТЕА во всех используемых концентрациях отрицательный инотропный эффект NaHS полностью сохранялся (рис. 4). Для блокирования потенциал-зависимых К-каналов использовали 4-аминопиридин (4-АП) в концентрациях 2.5 и 5 мМ. 4-АП в обеих концентрациях приводил к увеличению амплитуды сокращения

полоски миокарда до $133 \pm 12\%$ ($n=11$, $p<0.05$) и $191 \pm 30\%$ ($n=7$, $p<0.05$), соответственно (Рис. 4). Эффект NaHS на фоне действия 4-АП полностью сохранялся (Рис. 4).

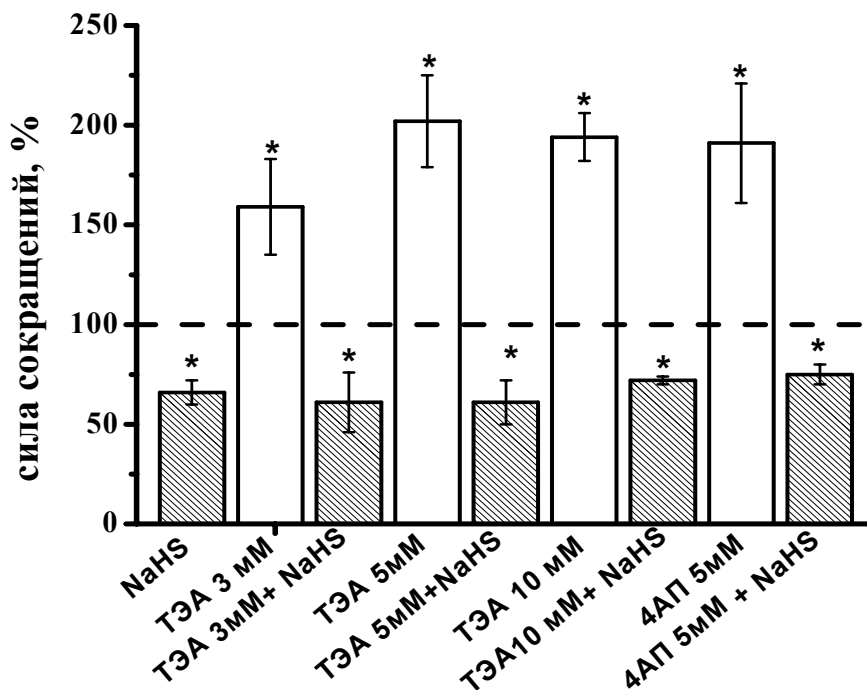


Рис. 4. Влияние NaHS на амплитуду сокращений миокарда в условиях ингибирования калиевых каналов разных типов

На диаграмме показан эффект NaHS в контроле, тетраэтиламмония (ТЕА) в разных концентрациях (3, 5, 10 мМ), 4-аминопиридина (4-АП) (5 мМ) и NaHS на фоне действия блокаторов. При анализе эффектов NaHS за 100% принимались значения, полученные в контроле и на фоне действия ТЭА или 4-АП.

* $p<0.05$

Известно, что Ca-активируемые К-каналы могут быть мишенью действия H_2S (G.F. Sitdikova, 2010), активация которых в сердце теплокровных животных приводит к укорочению потенциала действия и снижению амплитуды сокращения миокарда. Блокатор Ca-активируемых К-каналов малой проводимости – NS 8593 в концентрации 1 мкМ не приводил к достоверным изменениям амплитуды сокращения полоски миокарда. Эффект NaHS в данных условиях полностью сохранялся. Полученные данные свидетельствуют, что отрицательный инотропный эффект NaHS в миокарде лягушки не связан с изменением работы потенциал-зависимых и кальций-активируемых К-каналов.

Роль АТФ-чувствительных К-каналов в эффектах сероводорода.

Одним из известных механизмов действия H_2S в гладких мышцах сосудов и кардиомиоцитах крысы является активация АТФ-зависимых К-каналов (К(АТФ)-каналы) (В. Cheng, 2004, W. Zhao, 2001, Д.В. Абрамочкин, 2009).

Для активации K(ATФ)-каналов использовали миноксидил (100 мкМ) и диазоксид (200 мкМ). При добавлении миноксидила происходило уменьшение силы сокращения полоски миокарда до $51 \pm 7\%$ ($n=5$, $p<0.05$), диазоксида - до $68 \pm 8\%$ ($n=12$, $p<0.05$).

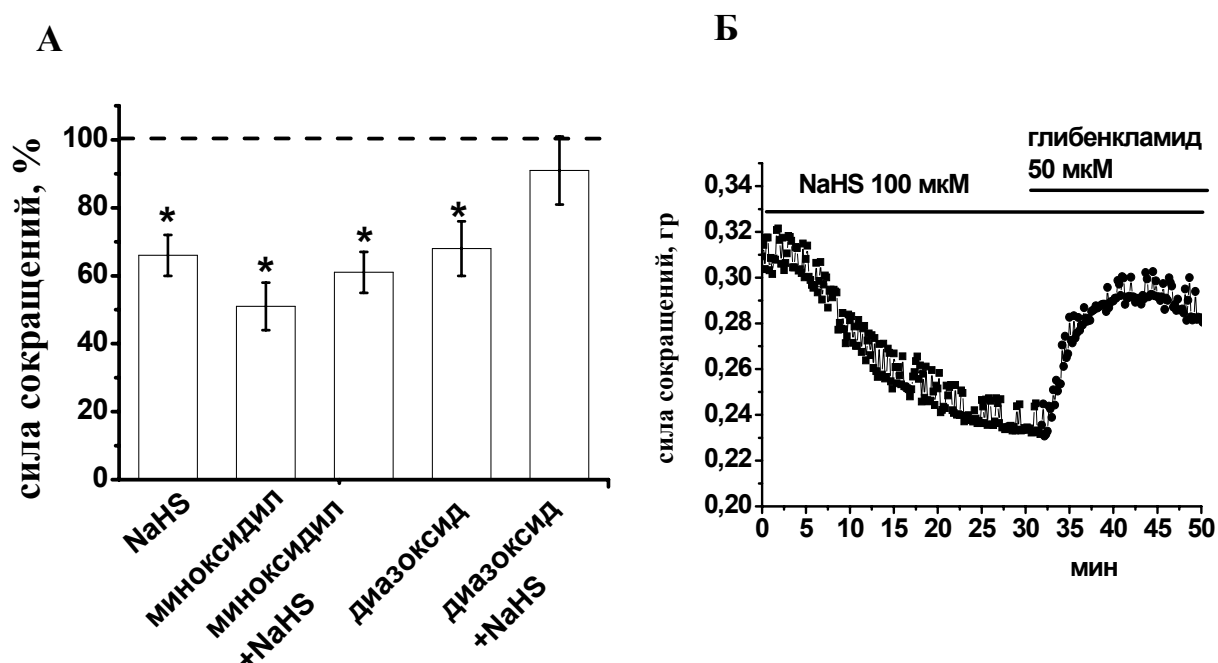


Рис. 5. Роль K(ATФ)-каналов в эффектах сероводорода на силу сокращения миокарда лягушки

А - На диаграмме показаны амплитуды сокращений миокарда при действии NaHS в контроле, миноксидила (100 мкМ), диазоксида (200 мкМ) и NaHS на фоне действия данных соединений. При анализе эффектов NaHS за 100% принимались значения, полученные на фоне действия миноксидила или диазоксида. * - $p<0.05$

Б - Пример эксперимента, в котором блокатор K(ATФ)-каналов глибенкламид 50 мкМ восстанавливает силу сокращения миокарда после действия NaHS.

На фоне миноксидила отрицательный инотропный эффект NaHS сохранялся, амплитуда сокращений уменьшалась до $61 \pm 6\%$ ($n=5$, $p<0.05$) (Рис. 5 А), однако, на фоне действия диазоксида NaHS не приводил к изменениям амплитуды сокращения, которая к 20 мин составила 91 ± 10 ($n=10$, $p>0.05$) (Рис. 5 А). По-видимому, эффект миноксидила в миокарде лягушки не является специфичным для K(ATФ)-каналов, а снижение силы сокращения при действии миноксидила может быть связано с ингибированием Са-каналов L-типа, показанное в желудочковых кардиомиоцитах морской свинки (S. Hayashi, 1993). Блокатор K(ATФ)-каналов глибенкламид в концентрации 50 мкМ не изменял достоверно силу сокращения полосок миокарда $108 \pm 5\%$ ($n=12$, $p<0.05$). В условиях блокирования K(ATФ)-каналов глибенкламидом, NaHS снижал силу сокращения миокарда до $78 \pm 1\%$ ($n=13$, $p<0.05$), что достоверно меньше

эффекта NaHS в контроле. Было предположено, что снижение силы сокращения при действии NaHS может быть связано с активацией K(ATФ)-каналов. Эту гипотезу подтвердили эксперименты, в которых глибенкламид апплицировали после развития эффекта NaHS. В результате добавления глибенкламида происходило восстановление амплитуды сокращения полоски миокарда в среднем на $16 \pm 4\%$ ($n=5$, $p<0.05$) (Рис.5 Б). Полученные данные указывают, что K(ATФ)-каналы участвуют в реализации отрицательного инотропного эффекта NaHS в миокарде лягушки.

Эффекты сероводорода на фоне закисления внутриклеточной среды кардиомиоцитов. Известно, что внутриклеточный pH играет важную роль в регуляции сократимости миокарда. «Закисление» внутриклеточной среды кардиомиоцитов сопровождается накоплением ионов Ca в результате изменения направления работы Na/Ca-обменника и снижения функциональной активности Ca-насосов плазматической мембраны и саркоплазматического ретикулума, уменьшением чувствительности миофибрилл к ионам Ca. В результате происходит снижение сократительной функции миокарда. Имеются данные о том, что H₂S вызывает закисление внутриклеточной среды в гладкомышечных клетках аорты крысы путем активации Cl⁻/HCO₃⁻ обменника, что частично опосредует H₂S-вызванную вазорелаксацию (S.W. Lee et al., 2007). Кроме того, накопление избыточного количества протонов (Na⁺, H⁺) в кардиомиоцитах происходит и при некоторых патофизиологических состояниях в условиях анаэробного гликолиза. Учитывая, что H₂S в высоких концентрациях может нарушать процессы окислительного фосфорилирования, сопровождающееся закислением внутриклеточной среды, исследовали эффекты газа на фоне действия пропионата натрия, который проникая через клеточную мембрану, закисляет содержимое клетки. В данной серии экспериментов регистрацию силы сокращений в контроле осуществляли в растворе пропионата натрия в концентрациях 20 и 40 мМ. Эффект NaHS на фоне действия пропионата полностью сохранялся и составил 66 ± 6 ($n=4$, $p<0.05$), $63 \pm 13\%$ ($n=8$, $p<0.05$) по отношению к начальному уровню, что не отличается от действия NaHS в контроле.

Роль аденилатциклазной системы в эффектах сероводорода на сократимость миокарда. В нервной системе и кардиомиоцитах теплокровных животных эффекты H₂S могут быть опосредованы через изменение уровня цАМФ (Q.C. Yong, 2008, H.Kimura 2000). Увеличение уровня цАМФ является механизмом регуляции сократимости миокарда в ответ на активацию β-адренорецепторов. Для блокирования синтеза цАМФ использовали MDL-12,330A в концентрации 3 мкМ, аппликация которого приводила к понижению силы сокращения миокарда до $81 \pm 3\%$ ($n=11$; $p<0,05$) (Рис. 6). Эффект NaHS на фоне действия MDL-12,330A был выражен в

меньшей степени, чем в контроле и составил $87 \pm 2\%$ ($n=13$, $p<0.05$) (Рис 6) по отношению к начальному уровню.

Для увеличения концентрации цАМФ использовали мембранопроницающие аналоги – 8BrcAMP и pCPTcAMP в концентрации 100 мкМ. Аппликация 8BrcAMP или pCPTcAMP не приводила к достоверным изменениям амплитуды сокращения. К 20 мин действия 8BrcAMP сила сокращения полосы миокарда составила $101 \pm 5\%$ ($n=5$, $p>0.05$), а pCPTcAMP – $110 \pm 11\%$ ($n=5$, $p>0.05$) (Рис.6) по отношению к контрольным значениям. Добавление NaHS на фоне действия 8BrcAMP снижало сократимость полосы до $70 \pm 6\%$ ($n=5$, $p<0.05$) и до $57 \pm 11\%$ ($n=5$, $p<0.05$) в случае pCPTcAMP (Рис. 6). Таким образом, эффект NaHS на фоне действия аналогов цАМФ сохранялся в той же степени, что и в контроле.

Другим способом увеличения уровня цАМФ в клетке является ингибирование фосфодиэстераз. Неспецифический блокатор фосфодиэстераз IBMX (200 мкМ) приводил к увеличению силы сокращения до $120 \pm 4\%$ ($n=7$, $p<0.05$) к 8 минуте аппликации, что, по-видимому, связано с накоплением цАМФ в кардиомиоцитах (Рис. 6). На фоне повышения уровня эндогенных циклических нуклеотидов NaHS снижал силу сокращения полосы миокарда до $82 \pm 4\%$ ($n=5$) и этот эффект был достоверно меньше, чем эффект донора H_2S в контроле ($p<0.05$) (Рис. 6).

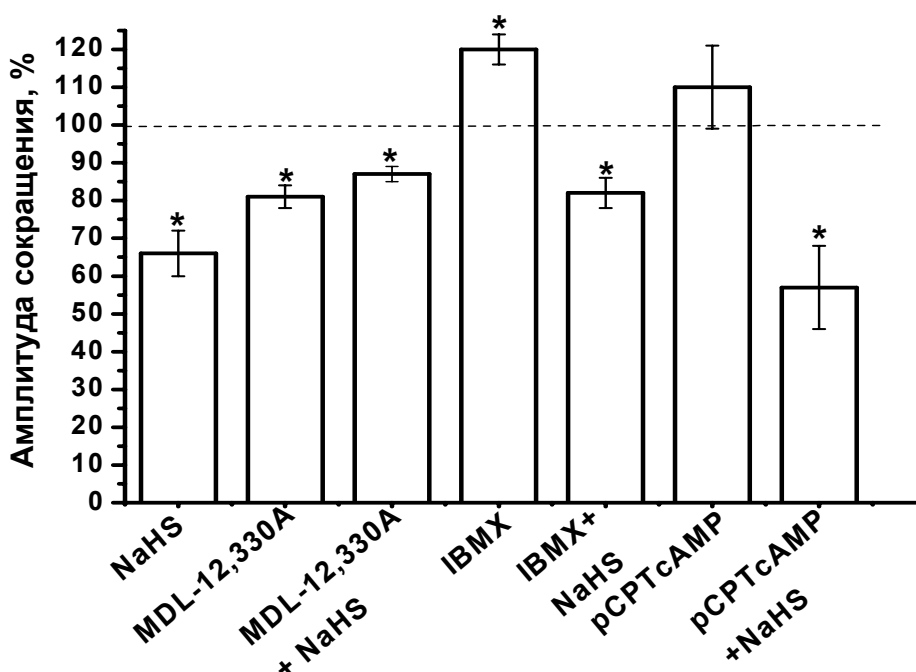


Рис. 6. Влияние гидросульфида натрия в условиях понижения и повышения уровня циклических нуклеотидов.

Представлены амплитуды сокращения миокарда при действии NaHS (100 мкМ) в контроле, MDL-12,330A (3 мкМ), IBMX (200 мкМ), pCPTcAMP (100 мкМ) и NaHS на фоне действия указанных агентов. При анализе эффектов NaHS за 100% принимались

значения, полученные в контроле и на фоне действия MDL-12,330A, IBMX, pCPTcAMP, соответственно.

*- $p < 0.05$

Таким образом, эффект H_2S частично снимался в условиях ингибирования аденилатциклазы или блокирования фосфодиэстераз, что подтверждает участие цАМФ-зависимых путей в регуляции сократимости при действии газа. Отсутствие эффекта pCPTcAMP или 8BrcAMP на силу сокращения миокарда свидетельствует о том, что они не могут имитировать ситуацию, при которой повышается эндогенный уровень цАМФ (как в случае с IBMX). Кроме того, одним из ключевым факторов влияния цАМФ на сократимость является компартментализация этого циклического нуклеотида вблизи мишеней действия, а повышение общего уровня циклического нуклеотида недостаточно для специфической регуляции белковой мишени (M. Zaccolo et al., 2009). Полученные данные указывают на то, что отрицательный инотропный эффект NaHS в миокарде лягушки может быть связан с активацией фосфодиэстераз, гидролизующих цАМФ вблизи потенциал-зависимых Ca -каналов и снижающих, соответственно, количество активных цАМФ-зависимых протеинкиназ.

Роль оксида азота в эффектах сероводорода на сократимость миокарда. Известно, что NO является важным регулятором силы сокращения в миокарде у лягушки (J.M. Chesnais, R. Fischmeister, P.F. Méry, 1999). Исходя из данных о взаимодействии NO и H_2S в регуляции сосудистого тонуса (R.Hosoki et al., 1997, S.Kubo et al., 2007), нами был проведён анализ эффектов NaHS в условиях ингибирования синтеза NO и повышения его эндогенной концентрации. Блокатор различных форм NO-синтаз L-NAME (100 мкМ) приводил к повышению амплитуды сокращений, которая к 15 мин аппликации составила $115 \pm 4\%$ ($n=7$, $p < 0.05$) (Рис. 7 А). В условиях блокирования синтеза NO NaHS снижал силу сокращений миокарда до $65 \pm 8\%$ ($n=7$) (Рис. 7 А), что не отличалось от эффекта H_2S в контроле и указывает на отсутствие влияния NaHS на синтез NO. Донор NO – SNAP в концентрации 10 мкМ уменьшал сократимость миокарда до $86 \pm 5\%$ ($n=10$, $p < 0.05$) (Рис. 7 А). На фоне действия SNAP отрицательный инотропный эффект NaHS был значительно меньше выражен, чем в контроле и составил $89 \pm 2\%$ ($n=11$, $p < 0.05$) (Рис. 7 А). Полученные данные указывают на участие сигнальных путей, запускаемых NO в эффектах NaHS. Известно, что отрицательный инотропный эффект NO в миокарде лягушки опосредуется увеличением уровня цГМФ, мишенью которого является цГМФ-зависимая фосфодиэстераза (фосфодиэстераза II), активация которой ведет к понижению уровня цАМФ, угнетению Ca -тока и снижению силы сокращения (M. Dittrich et al., 2001). Было предположено, что предварительная аппликация донора NO приводит к активации фосфодиэстеразы II и снижению уровня цАМФ. В этих условиях эффект

NaHS уменьшался, что указывает на возможное участие фосфодиэстеразы этого типа в эффекте H_2S . Для подтверждения этой гипотезы использовали специфический блокатор цГМФ-стимулируемой цАМФ-специфичной фосфодиэстеразы (II типа) EHNA в концентрации 30 мкМ. На фоне действия EHNA отрицательный инотропный эффект NaHS не проявлялся, и к 20 мин аппликации сила сокращения миокарда составила $95 \pm 11\%$ ($n=6$, $p>0.05$) (Рис. 7 А).

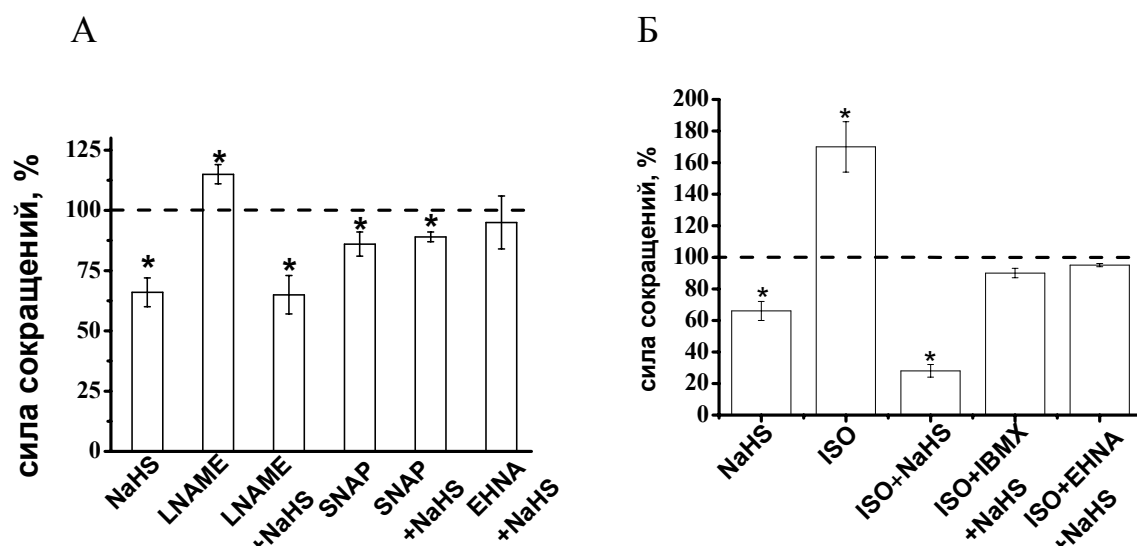


Рис. 7. Роль оксида азота, β -адренорецепторов и фосфодиэстеразы II в эффектах сероводорода

А – Показаны амплитуды сокращений миокарда при действии NaHS в контроле, LNAME (100 мкМ), SNAP (10 мкМ) и NaHS на фоне действия LNAME (100 мкМ), SNAP (10 мкМ) и EHNA (30 мкМ).

Б - На диаграмме показаны амплитуды сокращений миокарда при действии NaHS в контроле, изопротеренола (ISO) (1 мкМ), NaHS на фоне ISO (1 мкМ) и ISO (1 мкМ)+IBMX (200 мкМ).

При анализе эффектов NaHS за 100% принимались значения, полученные на фоне действия вышеперечисленных веществ.

* - $p<0.05$

Эффекты сероводорода в условиях активации β -адренорецепторов и блокирования фосфодиэстераз. Для активации β -адренорецепторов в кардиомиоцитах использовали изопротеренол в концентрации 1 мкМ. Аппликация изопротеренола вызывала увеличение силы сократимости миокарда до $170 \pm 16\%$ ($n=11$, $p<0.05$) (рис. 7 Б). Эффект NaHS на силу сокращения миокарда в условиях предварительной активации β -адренорецепторов изопротеренолом составил $28 \pm 4\%$ ($n=5$, $p<0.05$) (рис. 7 Б), что достоверно больше, чем действие NaHS в контроле. По-видимому, это указывает на участие внутриклеточных систем, запускаемых при активации β -адренорецепторов в эффектах H_2S . Для подтверждения нашей гипотезы об участии фосфодиэстераз в эффектах NaHS использовали одновременную

аппликацию изопротеренола и IBMX. В условиях одновременной активации β -адренорецепторов и блокирования фосфодиэстераз IBMX отрицательный инотропный эффект NaHS практически не проявлялся, амплитуда сокращений составила $90 \pm 3\%$ ($n=5$, $p>0.05$) (рис. 7 Б). Для подтверждения нашей гипотезы об участии фосфодиэстеразы II в эффектах H_2S использовали EHNA в концентрации 30 мкМ. В условиях одновременной активации β -адренорецепторов и блокирования фосфодиэстеразы II отрицательный инотропный эффект NaHS также не проявлялся и амплитуда сокращений составила $94 \pm 7\%$ ($n=6$, $p>0.05$)

На основании полученных данных можно предположить, что отрицательный инотропный эффект NaHS опосредуется активацией фосфодиэстеразы II, что приводит к уменьшению уровня цАМФ и снижению входящего Са-тока.

Заключение

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что донор сероводорода - NaHS оказывает отрицательный инотропный эффект в миокарде лягушки, уменьшая максимальные скорости укорочения и расслабления полосы. Субстрат синтеза H_2S - L-цистеин вызывал снижение амплитуды сокращений миокарда аналогичное действию NaHS, тогда как блокаторы цистатионин γ -лиазы вызывали противоположный эффект. При этом в условиях ингибирования цистатионин γ -лиазы эффект L-цистеина не проявлялся, что указывает на возможность синтеза H_2S в миокарде холоднокровных животных ферментом цистатионин γ -лиаза. Анализ ионных механизмов действия H_2S выявил отсутствие его влияния на потенциал-зависимые Са-каналы L-типа, Са-каналы внутриклеточных Са-депо, потенциал- и кальций-активируемые К-каналы малой проводимости. Использование активаторов и блокатора К(АТФ)-каналов позволило сделать заключение, что К(АТФ)-каналы участвуют в реализации отрицательного инотропного эффекта NaHS в миокарде лягушки. По-видимому, активация калиевой проводимости под действием H_2S приводит к укорочению потенциала действия, снижению входящего Са-тока, что, в свою очередь, ведет к уменьшению силы сокращения миокарда.

Известно, что регуляция Са-тока и сократимости может осуществляться опосредовано через фосфорилирование протеинкиназами А потенциал-зависимых Са-каналов при повышении уровня цАМФ в ответ на активацию β -адренорецепторов (Т.Д. Камп et al., 2000). В наших экспериментах как снижение (блокирование аденилатциклазы), так и повышение эндогенного уровня цАМФ (блокирование фосфодиэстераз) уменьшало отрицательный инотропный эффект H_2S . По-видимому, эффект NaHS реализуется путем уменьшения внутриклеточной концентрации цАМФ в результате снижения активности аденилатциклазы, либо активации фосфодиэстераз. Исследование взаимодействия двух систем газообразных

посредников – H_2S и NO показало, что на фоне предварительной аппликации донора NO SNAP эффект NaHS был выражен в меньшей степени, чем в контроле, что может быть связано с участием сигнальных систем, активируемых NO в эффектах H_2S . Действительно, на фоне ингибирования цГМФ-активируемой фосфодиэстеразы (фосфодиэстеразы II) EHNA эффект NaHS полностью предотвращался.

В желудочковых кардиомиоцитах лягушки Ca -ток регулируется локальным повышением уровня цАМФ вблизи цитоплазматической мембраны, а фосфодиэстеразы обеспечивают компартментализацию цАМФ, предотвращая его диффузию вдоль длины кардиомиоцита. Действительно, в наших экспериментах в условиях локального повышения уровня цАМФ при активации β -адренорецепторов эффект H_2S был выражен сильнее, чем в контроле. При этом одновременная активация β -адренорецепторов и блокирование фосфодиэстераз IBMX или EHNA предотвращало развитие отрицательного инотропного эффекта H_2S .

Таким образом, в основе отрицательного инотропного действия H_2S в миокарде лягушки лежит снижение уровня цАМФ и усиление гидролиза циклического нуклеотида в результате активации цГМФ-стимулируемых фосфодиэстераз II типа. В результате происходит уменьшение активности цАМФ-зависимых протеинкиназ и фосфорилирования потенциал-зависимых Ca -каналов, уменьшение входа Ca в клетку и снижение силы сокращения миокарда.

Выводы

1. Донор сероводорода NaHS вызывает дозозависимое и обратимое снижение амплитуды сокращения миокарда лягушки, уменьшая максимальные скорости укорочения и расслабления полосы.
2. L-цистеин – субстрат синтеза сероводорода оказывает отрицательный инотропный эффект в миокарде лягушки, тогда как блокаторы цистатиони- γ -лиазы – фермента синтеза H_2S – пропаргилгицин и β -цианоаланин увеличивали амплитуду сокращения полосы миокарда.
3. В условиях блокирования потенциал-зависимых Ca -каналов L-типа нифедипином и активации внутриклеточных Ca -депо кофеином эффект NaHS полностью сохранялся.
4. В условиях блокирования потенциал- и кальций-зависимых калиевых каналов тетраэтиламмонием, 4-аминопиридином и NS 8593 влияние NaHS на сократимость полосы миокарда не отличалось от контроля.
5. Эффект NaHS частично снимался при блокировании и активации АТФ-зависимых K -каналов глибенкламидом и диазоксидом, соответственно.
6. Отрицательное инотропное действие NaHS полностью сохранялось в условиях закисления внутриклеточной среды пропионатом натрия.

7. Влияние NaHS на сократимость миокарда уменьшалось при ингибировании аденилатциклазы с помощью MDL-12330A и в условиях блокирования различных типов фосфодиэстераз IBMX.

8. Отрицательный инотропный эффект NaHS не изменялся в условиях блокирования синтеза оксида азота (L-NAME), уменьшался на фоне предварительной аппликации оксида азота (SNAP) и полностью предотвращался в условиях блокирования фосфодиэстеразы II EHNA.

9. Эффект NaHS на силу сокращения миокарда был выражен в большей степени в условиях предварительной активации β -адренорецепторов изопротеренолом и не проявлялся при одновременной активации β -адренорецепторов и блокировании фосфодиэстераз IBMX или EHNA.

Список работ опубликованных по теме диссертации

1. Ситдикова Г. Ф., Герасимова Е. В., **Хаертдинов Н. Н.**, Зефиров А. Л. Роль циклических нуклеотидов в эффектах сероводорода на освобождение медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки. //Нейрохимия, 2009, т.26, № 4, С. 1-7. МАИК «Наука/Интерпериодика» ISSN(p): 1027-8133
2. Sitdikova G. F., Gerasimova E. V., **Khaertdinov N. N.**, Zefirov A. L. Role of Cyclic Nucleotides in Effects of Hydrogen Sulfide on the Mediator Release in Frog Neuromuscular Junction. //Neurochemical Journal, 2009, Vol. 3, No. 4, pp. 282–287
3. Ситдикова Г. Ф., **Хаертдинов Н. Н.**, Зефиров А. Л. Исследование роли кальциевых и калиевых каналов в эффектах сероводорода на сократимость миокарда лягушки.// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. -2011. – Т.151, № 2, С.124-128
4. Abramochkin D. V., **Haertdinov N. N.**, Porokhnya M. V., Zefirov A. L., Sitdikova G. F., Carbon monoxide affects electrical and contractile activity of rat myocardium. // Journal of Biomedical Science 2011, 18:40 doi:10.1186/1423-0127-18-40.
5. Абрамочкин Д. В., **Хаертдинов Н. Н.**, Порохня М. В., Зефиров А. Л., Ситдикова Г. Ф., Влияние монооксида углерода на параметры электрической и сократительной активности предсердного миокарда крысы. // доклады академии наук, 2011, том 439, № 2, с. 274–278
6. **Хаертдинов Н. Н.**, Ахметшина Д. Р., Зефиров А. Л., Ситдикова Г. Ф. Сероводород в регуляции сократимости миокарда лягушки// Биологические мембраны (принята в печать) 2012
7. **Хаертдинов Н. Н.**, Сергеева Е. В. Влияние сероводорода на частоту и силу сокращения сердца лягушки // Тезис в сборнике. Биология наука XXI века. 13-я международная конференция молодых ученых. Пущино 2009. С.127.
8. **Хаертдинов Н. Н.**, Сергеева Е. В. Исследование нового газообразного посредника-сероводорода на сократимость миокарда желудочков лягушки. // Тезис в сборнике. Биология наука XXI века. 13-я международная конференция молодых ученых. Пущино 2009. С.127-128.

9. **Khaertdinov N. N.**, Sergeeva E. V., Shafigullin M. U. Hydrogen sulfide influence on rana ridibunda myocard contractility // Тезис в сборнике. Abstracts of the 13th annual Symposium for Biology Students of Europe «SymBioSE 2009» «Biology: Expansion of Borders» P.103-104.
10. Ситдикова Г. Ф., **Хаертдинов Н. Н.**, Зефилов А. Л. Влияние донора сероводорода - гидросульфида натрия на сократимость изолированной полоски миокарда желудочка лягушки. // VII Всероссийская конференция с международным участием “Механизмы функционирования висцеральных систем”, посвященной 160-летию со дня рождения И.П. Павлова - Санкт-Петербург, 29 сентября – 2 октября 2009 года. – С. 46.
11. **Хаертдинов Н. Н.**, Яковлева О. В. Влияние сероводорода на сократимость миокарда в условиях ингибирования NO – синтазы. // Тезис в сборнике. XV Всероссийская научно- практическая конференция 2010. С. 297-298.
12. **Khaertdinov N. N.**, Yakovlev A. V., Sitdikova G. F. Effects of hydrogen sulfide on frog myocardium after inhibition of ATP-depended potassium channels. // Biological motility: from fundamental achievements to nanotechnologies. – Pushchino: Synchrobook – 2010 - P. 122-125
13. **Хаертдинов Н. Н.**, Ситдикова Г. Ф. Роль калиевых каналов в отрицательном инотропном эффекте сероводорода на сердце лягушки. // Тезисы докладов XXI Съезда физиологического общества им. И.П.Павлова, Калуга 19-25 сентября 2010, М.-Калуга: ООО “БЕСТ-принт”, стр 650.
14. Ситдикова Г. Ф., **Хаертдинов Н. Н.** Роль аденилатциклазной системы в эффектах сероводорода на сократимость миокарда лягушки. // Материалы X юбилейной Всероссийской научной конференции с международным участием «Физиологические механизмы адаптации растущего организма», Казань, 25-27 июня 2010 г, Казань: ТГГПУ, С. 174-175.
15. **Хаертдинов Н. Н.**, Ахметшина Д. Р. Эффекты сероводорода на сократимость миокарда лягушки в условиях блокирования АТФ-зависимых калиевых каналов. // Тезис в сборнике. XVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых. Ломоносов-2010 С.290-291.
16. **Хаертдинов Н. Н.**, Ахметшина Д. Р., Ситдикова Г. Ф. Влияние сероводорода на сократимость миокарда лягушки Rana Ridibunda и роль калиевых каналов в его эффектах. // Рецепция и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. - Пущино.- 2011. – Т.1.-С. 162 -166
17. **Хаертдинов Н. Н.**, Шафигуллин М. У., Ахметшина Д. Р. Исследование роли внутриклеточной концентрации кальция в эффектах сероводорода на сократимость миокарда лягушки. // XVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых. Сборник тезисов докладов «Ломоносов – 2011» – Москва, 2011 г. – С. 247-248.
18. **Хаертдинов Н. Н.**, Ахметшина Д. Р., Валиуллина Ф. Ф., Ситдикова Г. Ф. Выявление ионных механизмов действия сероводорода в миокарде

- лягушки. //Сборник статей по материалам II международной научной конференции "Свободные радикалы, антиоксиданты и старение", Астрахань:АГУ, С. 155-158
19. Ахметшина Д. Р., **Хаертдинов Н. Н.** Эндогенный уровень цАМФ опосредует эффекты гидросульфида натрия на силу сокращения миокарда лягушки. // XLIX Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс» - Новосибирск, 16-20 апреля 2011 г. - С. 4.
20. Ахметшина Д. Р., **Хаертдинов Н. Н.**, Ситдикова Г. Ф. Роль оксида азота в эффектах сероводорода на сократимость миокарда лягушки. // XIV международное совещание и VII школа по эволюционной физиологии, посвященные памяти академика Л.А. Орбели. Сборник тезисов докладов и лекций – Санкт-Петербург, 24-29 октября 2011 г. – С. 20-21.

Выражаю искреннюю благодарность чл.-корр. РАН, д.м.н., профессору Зефирова Андрею Львовичу за консультативную помощь и ценные рекомендации при выполнении и обсуждении работы.